

by: Brian Fish

**TITLE: CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN  
OF THE IL-2 RECEPTOR**

**ABSTRACT:**

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of T-cell mediated human disorders, the compositions containing human-like immunoglobulins specifically capable of blocking the binding of human IL-2 to its receptor and/or capable of binding to the p55 Tac protein on human IL-2 receptors. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, typically at least one pair having chains comprising mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be used to produce human-like antibodies capable of binding to the human IL-2 receptor at affinity levels stronger than about  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives, of the present invention may be produced by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for human-like immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The human-like immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or complexed with a cytotoxic agent, such as a radionuclide, a ribosomal inhibiting protein or a cytotoxic agent active at cell surfaces. All of these compounds will be particularly useful in treating T-cell mediated disorders. The human-like immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form, which is dependent on the mode of administration.

The present invention also provides novel methods for designing human-like immunoglobulin chains having one or more complementarity determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin, the preferred methods comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. The human immunoglobulin, or acceptor immunoglobulin, sequence is typically selected from a collection of at least 10 to 20 immunoglobulin chain sequences, and usually will have the highest homology to the donor immunoglobulin sequence of any sequence in the collection. The human immunoglobulin framework sequence will typically have about 65 to 70% homology or more to the donor immunoglobulin framework sequences. The donor immunoglobulin may be either a heavy chain or light

chain (or both), and the human collection will contain the same kind of chain. A humanized light and heavy chain can be used to form a complete humanized immunoglobulin or antibody, having two light/heavy chain pairs, with or without partial or full-length human constant regions and other proteins.

In another embodiment of the present invention, either in conjunction with the above comparison step or separately, additional amino acids in an acceptor immunoglobulin chain may be replaced with amino acids from the CDR-donor immunoglobulin chain. More specifically, further optional substitutions of a human framework amino acid of the acceptor immunoglobulin relying on a framework amino acid from a donor immunoglobulin will be made at positions in the immunoglobulins where:

- (a) said amino acid in the human framework region of an acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or
- (b) said amino acid is immediately adjacent to one of the CDR's; or
- (c) said amino acid is predicted to be within about 3Å of the CDR's in a three-dimensional immunoglobulin model and capable of interacting with the antigen or with the CDRs of the humanized immunoglobulin.

The humanized immunoglobulin chain will typically comprise at least about 3 amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three of the position criteria.

When combined into an intact antibody, the humanized light and heavy chains of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen (such as a protein or other compound containing an epitope). These affinity levels can vary from about  $10^8$  M<sup>-1</sup> or higher, and may be within about 4 fold of the donor immunoglobulin's original affinity to the antigen.

⑬ 公表 平成4年(1992)5月7日

⑭ Int. Cl.<sup>1</sup>  
C 12 P 21/08

⑮ 識別記号

⑯ 庁内整理番号

8214-4B  
8717-4B  
7236-4B

⑰ 審査請求 未請求

⑱ 予備審査請求 有

C 12 N 15/00  
5/00

⑲ 部門(区分) 1(1)

A  
B※

(全 16 頁)

⑳ 発明の名称 1L-2レセプターのp55 Tacタンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

㉑ 特 願 平2-503577

㉒ 出 願 平1(1989)12月28日

㉓ 出願文提出日 平3(1991)5月1日

㉔ 国際出願 PCT/US89/05857

㉕ 国際公開番号 WO90/07861

㉖ 国際公開日 平2(1990)7月26日

㉗ 優先権主張 ①1988年12月28日②米国(US)③290,975

㉘ 発 明 者 クイーン、カリ エル、 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94304、パロ アルト、オーク  
クリーク ドライブ 1300

㉙ 出 願 人 プロテイン デザイン ラブ アメリカ合衆国、カリフォルニア 94304、パロ アルト、ポータ  
ス、インコーポレイテッド - ドライブ 3181

㉚ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

㉛ 指 定 国 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CF(広域  
特許), CG(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, ES(広域特  
許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR,  
LK, LU, LU(広域特許), MC, MC(広域特許), ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), N  
O, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

# 請求の範囲

1. p55 Tacタンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 前記免疫グロブリンが2対の軽鎖/重鎖二量体を含んで成り、各鎖が可変領域と定常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
3. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒト1L-2の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。
4. 前記免疫グロブリンが約  $10^6 M^{-1}$  またはそれより強いヒトインターロイキン-2 (IL-2) への結合親和性を示す、請求項1に記載の組成物。
5. 前記免疫グロブリンが1つの免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
6. ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域および天然には該フレームワークと関連がない1または複数の外來の相補性決定領域を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、前記免疫グロブリンがヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができる組成物。
7. 前記免疫グロブリンがIgG免疫グロブリンイソタイプである、請求項5に記載の組成物。
8. 成熟軽鎖および重鎖可変領域タンパク質配列が図3お

よび図4中の成熟タンパク質配列と実質的に相同である、請求項6に記載の組成物。

9. 2対の軽鎖/重鎖二量体を有し且つ少なくとも約  $10^6 M^{-1}$  の親和力でヒトインターロイキン-2 レセプター上のエピトープと特異的に反応することができるヒト免疫グロブリンであって、前記軽鎖および重鎖が相補性決定領域(CDR)とヒト免疫グロブリンフレームワーク領域を含んで成り、ここでCDRが該フレームワーク領域とは異なる免疫グロブリンからのものである、ヒト免疫グロブリン。

10. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのインターロイキン-2 (IL-2) の結合を阻止することができる、請求項9に記載の免疫グロブリン。

11. ヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができるヒト免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンフレームワーク中に抗-Tac抗体からの1または複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成り、ここで前記ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域は抗-Tac抗体から選択された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト免疫グロブリン。

12. 図3に示されるような成熟重鎖可変配列、および図4に示されるような成熟軽鎖可変配列を有する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。

13. 抗-Tac抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。

14. ヒト患者においてT細胞介在性障害を処置する方法であって、前記患者に治療的有効量の請求項1に記載の免疫グ

ロブリンを授与することを含んで成る方法。

15. ミニローマまたはハイブリドーマ細胞中で生成された請求項1に記載の免疫グロブリン。

16. ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列およびまたは複数のマウス免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、発現時に p55 Tacタンパク質と特異的に反応し且つヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプター (IL-2) へのIL-2の結合を阻止することができる免疫グロブリンをコードする前記ポリヌクレオチド分子。

17. 請求項16のポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた細胞系。

18. 供与体Igからの1または複数の相補性決定領域およびヒトIgからのフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリン鎖の設計方法であって、供与体Ig軽鎖または重鎖のフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒトIg鎖のコレクション中の対応する配列と比較し；そしてヒトIg軽鎖または重鎖のフレームワークを提供するためにコレクションからの約3つの最も相同性の配列のうちの1つを選択することを含んで成る方法。

19. ヒト受容体免疫グロブリンからのフレームワーク領域および抗原に結合することができる供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリン鎖の設計方法であって、下記のような免疫グロブリン中の位置において、受容体免疫グロブリンの少なくとも1つのヒトフ

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの対応するアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法；

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてまれであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において普通である；または

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内に側鎖原子を有しそして抗原またはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用することができると予想される。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン鎖が、CDRに加えて、基序(a)、(b)または(c)により選択された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つがCDRのすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18、19または20に従って設計されたヒト化免疫グロブリン。

## 明 細 書

IL-2レセプターの p55 Tacタンパク質に  
特異的なキメラ免疫グロブリン

### 発明の分野

本発明は一般に、新規治療薬を開発するための置換えDNA技術とモノクローナル抗体技術の組合せに関し、更に詳しくは、非免疫原性抗体の製造およびそれらの利用に関する。

### 発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫応答が媒介される。それらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞サブセットを含む。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初はT細胞増殖因子と命名されたインターロイキン-2 (IL-2) として知られるリンホカインの生産を通してである。IL-2の主な機能はT細胞の刺激と維持であると思われる。実際、成る免疫学者はIL-2が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている (Farrar, J.ら, *Immunol. Rev.* 63: 123-166 (1982)参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2は特異的な高

親和性膜レセプターと相互作用する (Greene, M.ら, *Progress in Hematology* 117, E. Brown編, Grunc and Statton, New York (1986), 283-頁)。ヒトIL-2レセプターは複雑な多量体の糖タンパク質であり、1本の鎖は Tacペプチドとして知られ約55kDのサイズである (Leonard, M.ら, *J. Biol. Chem.* 260: 1872 (1985)参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む272アミノ酸のペプチドを推定している (Leonard, M.ら, *Nature* 311: 626 (1984)参照)。p55 Tacタンパク質のN-末端の219アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る (Leonard, M.ら, *Science* 230: 633-639 (1984)参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

ヒトIL-2レセプターの構造と機能の解明のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tacとして知られるマウスモノクローナル抗体 (Uchiyamaら, *J. Immunol.* 126: 1393 (1981)) は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単核-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出され得ることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または樹状細胞マクロファージは、典型的にはIL-2レセプターを提示しない (Herrmannら, *J. Exp. Med.* 152: 1111 (1985))。

抗-Tacモノクローナル抗体は、IL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を明らかにするために用いられており、

そして細胞培養における細胞毒性およびナブレッナーTリンパ球の発育を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、様々な障害、特に成人T細胞白血病がT細胞による不適当なIL-2レセプター発現に関係づけられている。

より最近になって、IL-2レセプターはT細胞介在性疾患に対する新規治療アプローチの理想的な標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独または免疫複合体（例えばリシンA鎖、同位体等との免疫複合体）として用いて、IL-2レセプターを有する細胞を効果的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの薬剤は、理論上はIL-2レセプターを発現している白血病細胞、或る種のB細胞、または病状に関与する活性化されたT細胞を排除することができ、その上さらに必要とされる時には成熟正常T細胞およびその前駆体の保持によって正常T細胞免疫応答を開始する能力を促進する。一般に、他のT細胞特異的薬剤の多くは本質的に全ての周囲のT細胞を破壊し得、このことは薬剤の治療効能を制限する。全体に、IL-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、器官移植および活性化されたT細胞による任意の望ましくない応答において選択的効用を有することができ、実際、例えば抗-Tac抗体を使って臨床試験が開始されている（一般に、Waldman, T.ら、*Cancer Res.* 45: 625 (1985)およびWaldman, T., *Science* 232: 727-732 (1986)を参照のこと；これらは参

考として本明細書中に組み込まれる）。

不運にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような繰り返しの治療法において、投与の欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト細胞を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能特性を欠く。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原性となるであろう実質的長きのアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入後、抗体に対して患者により誘起された免疫応答が非常に強力であり、最初の処置後の抗体の治療効用を本質的に排除しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処置するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性（ヒトに対して）モノクローナル抗体が開発されるのが期待されるので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一または第二の処置後、無関係の治療のためさえもその後の処置が無効または危険になり得る。

いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）は幾らか好結果であることが判明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトIL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を使うことは非常に困難である。同様に、いわゆる「ヒト化された」抗体（例えばEPO公報No 0239400を参照のこと）を作製するために超微細DNA技術を使用すること

は、一部は予想不可能な結合親和性のためである不確かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療剤および他の用途に適当である形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト免疫グロブリン、例えばヒトIL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

#### 発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、IL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができそして/またはヒトIL-2レセプター上のp55 Tacタンパク質に結合することができるヒト免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成る鎖を有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^6 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてヒトIL-2レセプターに結合することができるヒト抗体を生産することができる。

結合性断片または他の誘導体を包含する免疫グロブリンは、様々な超微細DNA技術により、トランスフェクトされた細胞、好ましくは不死化された真核細胞、例えばミエロママ

またはハイブリドーマ細胞中での最大発現を使って生産することができる。ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを融合することによって作製することができる。

ヒト免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射性核種、リボソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において活性な細胞毒性物質と複合体化して、使用することができる。それらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される障害を処置することにおいて有用であろう。ヒト免疫グロブリンまたはそれらの複合体は、投与の形式に依存するであろう至適上許容される形態において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または複数の相補性決定領域(CDR) およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト免疫グロブリン鎖を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相同性の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで成る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10-20の免疫グロブリン鎖配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相溶性を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相溶性を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重鎖または軽鎖（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を含むだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常領域および別のタンパク質を含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を形成せしめることができる。

本発明の別の態様によれば、上記の比較段階と共にまたは別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリン組からのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定のには、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の異なる任意の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がその位置に希であり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に普遍である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3人以内であり、そしてヒト化免疫グロブリンの

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリン鎖は、典型的には、CDRに加えて、供与体免疫グロブリンからの少なくとも約3アミノ酸を含んでおり、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に結合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエヒトープを含むタンパク質または他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約  $10^6 M^{-1}$  以上から様々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものと親和力の約4倍以内であろう。

#### 図面の簡単な説明

図1：抗-Tac 重鎖（上行）およびEu重鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図2：抗-Tac 軽鎖（上行）およびEu軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac 重鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての錯誤アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのスクレオチドTCTAGAはIbaI部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸#20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac 軽鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての錯誤アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのスクレオチドTCTAGAはIbaI部位である。成熟軽鎖配列はアミノ酸#21のDで始まる。

図5：A、ヒト化抗-Tac 重鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。B、前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3' 方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。(B) 前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3' 方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のBlaI部位の位置が示されている。

図7：ヒト化抗-Tac 重鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuTAC1の略図。関係する制限部位が示されており、そして重鎖のコード領域が箱として表示されている。免疫グロブリン(Ig)プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。E.=重鎖ニホンハナ、Hvg=ヒグロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac 軽鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuLTACの略図。関係する制限部位が示されており、そして軽鎖のコード領域が箱として表示されている。Igプロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac 抗体またはヒト化抗-Tac 抗体に次いで複合としてフルオレセイン接合ヤギ抗マウスIg抗体またはヤギ抗ヒトIg抗体でそれぞれ染色されたHu-102およびJurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点線曲線は第一抗体が削除された時の結果を示し、実線曲線は記載された第一および第二（複合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指極されるような0~40ngの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニリン接合アビジンで染色されたHu-102細胞のフルオロサイトメトリー。

(B) 指極の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニリン接合アビジンで染色されたHu-102細胞のフルオロサイトメトリー。

## 発明の詳細な記載

本発明の一般項によれば、所望のエピトープ、例えばヒトT細胞上のI-L-2レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト免疫グロブリンが提供される。それらの免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^4 M^{-1}$ 、好ましくは $10^5 M^{-1}$ ～ $10^6 M^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒトI-L-2レセプターへのI-L-2の結合を阻止することができる。ヒト免疫グロブリンは、ヒト骨髄フレームワークを有し、そしてp55 Tacタンパク質上のエピトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、経皮的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト患者におけるT細胞介在性癌の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は4量体を含むことが知られている。各4量体は全く同じ2対のポリペプチド鎖から成り、各対は1本の「軽」(約25kD)鎖と1本の「重」(約50-70kD)鎖を有する。各鎖のNH<sub>2</sub>-末端は、主に抗原認識を担う約100-110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域で始まる。各鎖のCOOH-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。

軽鎖は $\kappa$ または $\lambda$ のいずれかとして分類される。重鎖は $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ または $\epsilon$ として分類(および細分類)され、そしてそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体のイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖中の可変および定常領域

に組み込まれる)。[一般に、Hoodら、"Immunology", Benjamin, N.Y., 第2版(1984);並びに HunkapillerおよびHood, *Nature*, 323: 15-16 (1985)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。]

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変(V)セグメントをヒト定常(C)セグメント、例えば $\gamma$ 、および $\mu$ に結合することができる。典型的な製法用キメラ抗体はマウス抗体からのVまたは抗原結合領域とヒト抗体からのCまたはエフェクター領域とから成るハイブリッドタンパク質である(例えば、A. T. C. 登録番号CRL 9688は抗-Tac キメラ抗体を分泌する)が、他の哺乳動物種を使用することもできる。

本明細書中で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabatら、前掲により定義されたように、単一種において異なる免疫グロブリン間で比較的に保存される免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の部分について呼称する。本明細書中で使用する「ヒト骨髄フレームワーク領域」なる用語は、各々存在する種においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約70またはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には75-85またはそれ以上のアミノ酸残基を含んで成るフレームワーク領域である。

本明細書中で使用する「ヒト免疫グロブリン」なる用語は、ヒト骨髄フレームワーク領域を含んで成る免疫グロブリン

は、約12またはそれより多数のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖は約12またはそれより多数のアミノ酸の「D」領域も含む(一般に、*Fundamental Immunology*, Paul, W. 編、第1巻、第131-166頁、Raven Press, N.Y. (1984)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗原結合部位を形成する。鎖は全て、3つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. 編、U.S. Department of Health and Human Services, (1983);並びにChothiaおよびLesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる)。各対の二本鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特異的エピトープへの結合を可能にする。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる1または複数のポリペプチドから成るタンパク質について呼称する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ および $\mu$ 定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fr. Fab およびF(ab)<sub>2</sub>並びに一本鎖を包含する(例えば、Hestonら、*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988)およびBirdら、*Science*, 242: 423-426 (1988)。これらは参考として本明

について言及し、この場合、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約85-90%、好ましくは約95%が同一である。よって、おそらくCDRを除くヒト免疫グロブリンの全ての部分が、1または複数の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に相同である。例えば、ヒト免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト定常領域キメラ抗体を包含しないだろう。

本発明の別の一般的概念によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を増加させるために、ヒト鎖またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の限定された数のアミノ酸が受容体I $\epsilon$ よりもむしろ供与体I $\epsilon$ 中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基序も含まれる。

本発明のこの概念は、(例としてCDRの入手法としてマウス抗体を使って)ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の2つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく：

(1) マウスCDRをヒトフレームワークと結合する時、CDRに密着したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかにCDRを歪め、そして歪められたCDRは供与抗体中のCDRが行うのと同じくらい効果的な抗原との接触を行うことができないと考える；

(2) また、CDRに密着しているがその一部ではない(即ちまだフレームワークの一部である)元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の源泉である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

それらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。それらの基準を単独でまたは必要な時に組み合わせて使用し、所望の親和力または他の特徴を獲得することができる。

基準Ⅰ: 受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相同である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体からの共通のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク(例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource)中のヒト重鎖(軽鎖)可変領域に対するマウス重鎖(軽鎖)可変領域の配列の比較は、異なるヒト領域に対する相同性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖(それぞれ軽鎖)に最も相同であるヒト重鎖(それぞれ軽鎖)の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリン類を含んで成るヒト化抗体の正

確な全形状が供与抗体の形状と非常に似ており、CDRを覆める見込みを減らすことができる。

典型的には、重鎖フレームワークを提供するために、少なくとも約10-20の別個のヒト重鎖の代表的コレクションの中の3-5の最も相同な重鎖可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、軽鎖についても同様にして選択されるだろう。好ましくは、1-3の最も相同な領域のうちの1つが使用されるだろう。選択された受容体免疫グロブリン類は、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好ましくは少なくとも約65%の相同性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリン類のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好ましくは、それらの基準の1つを満足するほとんどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されるだろう。

基準Ⅱ: ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない(即ち「まれである」; 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト重鎖(それぞれ軽鎖)V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す)場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である(即ち「普通である」; 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す)場

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をたまたまヒト抗体に典型的である供与抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にすることができる。

基準Ⅲ: ヒト化免疫グロブリン類中の3つのCDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し(Amitら、*Science*, 233, 747-753 (1986)、これは参考として本明細書中に組み込まれる)、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接触を維持するのに望ましいかもしれない。

基準Ⅳ: 典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の端つかのアミノ酸がCDRに密着しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、静電的相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の成る部位の約3人単位内に側鎖原子を有し、そして独立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従ってCDR原子と相互作用するこ

とができるような原子を含まなければならない。抗体などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータープログラムが一般に利用可能であり、そして当業者に周知である(Loewら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, 15: 55-66 (1988); Bruccoleriら、*Science*, 233: 755-758 (1986)を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる)。それらは本発明の部分を構成しない。実際、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能である既知の抗体を必要であれば別の抗体のモデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータープログラムを用いてコンピューター画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして種々のアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト療法において使用されるマウス抗体または成る場合にはキヌラ抗体を上回る少なくとも3つの相対的利点を有する:

1) エフェクター部分がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分と良好に反応することができる(例えば、補体依存性細胞障害作用(CDC)または抗体依存性細胞障害作用(ADCC)により、より効果的に癌細胞を破壊する)。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を認識しないであろう。従ってそのような在入抗体に対する抗体応答は全体的に外来のマウス抗体または部分的に外来のキヌラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 在入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも



ずっと短いヒト種中の半減期を有することが報告されている(D. Shewら, *J. Immunol.*, **138**: 4534-4538 (1987))。注入されたヒト化抗体は、おそらく天然のヒト抗体により類似した半減期を有し、より少量または少程度の用量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No.0239400に記載されたものに関して改訂されたヒト化免疫グロブリン(例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる)に特に関与される。その出願明細書(その開示は本発明の範囲から除かれる)は、成る種の免疫グロブリンについて、受容体抗体の軽鎖または重鎖可変領域中のCDR領域を異なる特異性の抗体からのCDRの類似部分(典型的には宿主の影響を受けやすい部分)で置換することを記載している。また、その出願明細書は、成る種の免疫グロブリンについて、抗原結合部位から(等価に)影響されやすい残基を単に移動する可能性を記載しており、この残基は明らかに残りのフレームワーク領域を含むことができる(特に、Amitら, *Science*, **233**: 747-753(1986))に記載されたような抗原結合に関与することが既知である残基、またはおそらく鎖間相互作用に必須である残基—ただしこれらの選択については出願明細書において不十分な指針しか与えられていない)。例えば、本発明の好ましい型は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ(または好ましくは各々)のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することを伴う。一般に、例えばコンホメーション(および普通はそれらの抗原結合特異性)を維持するためにCDRと連絡をとる

任意のフレームワーク残基が、上記に詳細に記載された本発明の好ましい型種の範囲内に特に含まれる。

1つの観点において、本発明は、希望のエピトープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエピトープ、に結合することができる免疫グロブリン(例えば抗-Tacモノクローナル抗体)からの重鎖および/または軽鎖CDR(典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する)をコードする置換DNAセグメントに向けられる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒト種フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖可変領域(ヒト種フレームワーク領域と共に)を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好ましいDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン最適化および重要でないアミノ酸置換のため、変換するようにそれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト種抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を発質転換またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はスクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、輕

鎖/重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の取得および精製を行うことができる。

ヒト定常領域DNA配列は、周知の方法に従って、種々のヒト細胞から、好ましくは不死化されたB細胞から単離することができる(Kabat, 前掲およびWP 87/02571を参照のこと)。例えば、ヒトκ免疫グロブリン定常およびJ領域遺伝子および配列はHeiterら, *Cell*, **22**: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 、遺伝子のスクレオチド配列はEl-Harionら, *Nucl. Acid Res.*, **10**: 4071 (1982)中に記載されている(その両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。本発明の免疫グロブリンを複製するためのCDRは、所望の抗原(例えばヒトIL-2レセプター)に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして誘導され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。DNA配列の適当な起源細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手法、例えばアフリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる["Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版(1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる]。

本明細書中に特定的に記載のヒト種免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同の」免疫グロブリンを容易に設計することができ、そして当業者に周知の様々な置換DNA

A技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は残りのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト種免疫グロブリンを基として、種々の異なるヒトフレームワーク領域を単独でまたは組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の複製は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発(GillmanおよびSmith, *Gene*, **8**: 81-97 (1979))並びにRobertsonら, *Nature*, **323**: 731-734 (1987)を参照のこと; この両者は参考として本明細書中に組み込まれる)により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫グロブリン活性(例えば抗体結合活性)を有する。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの機能性領域(例えば肺炎; 1987年12月15日提出の一般譲渡されたU.S.S.N. 132,387を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる)と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質(例えば免疫毒素)を製造することができる。

最終的に所望のヒト種抗体を発現することができる本発明の核酸配列は、様々な異なるポリスクレオチド(ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴスクレオチド等)および成分(例えばV、J、DおよびC領域)から、そして様々な異

なる技術により、形成せしめることができる。通常のゲノム配列を複製することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい（ヨーロッパ特許公報E0239400およびReichman, L.ら、Nature 322: 323-327 (1987)を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる）。

前に述べたように、該DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した（即ち、機能を保証するように配置させた）後で該配列が宿主中で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソードとしてまたは宿主染色体DNAの組み込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むだろう（例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

大腸菌(*E. coli*)は本発明のDNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適切な他の微生物宿主としては、バシラス属、例えばバシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、並びに他の腸内細菌、例えばサルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)および種々のシュードモナス属(*Pseudomonas*)種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列（例えば複製開始点）を含むであろう発現ベクターを複製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リプトファン(*trp*)プロモーター系、 $\theta$ -ラクトターゼプロモーター系、またはメファージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。ヤッコロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、適当なベクターは、発現調節配列、例えば3'-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを包含するプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結配列等を有する。

微生物に加えて、哺乳動物細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる

(Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際には真核細胞が好ましい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、ミニローマ細胞系等が挙げられるが、好ましくは形質転換されたB細胞またはハイブリドーマである。それらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー(Queen, C.ら、Immunol. Rev. 89: 49-68 (1985)；これは参考として本明細書中に組み込まれる

る)、および必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、エンハンサーを有するSV40(MulliganおよびBerg, Science 209: 1422-1427 (1980)を参照のこと)、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ワクチン様ウイルス等に由来するプロモーターである。

寄目のDNAセグメント（例えば、重鎖および軽鎖コード配列並びに発現調節配列）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される（一般には、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1982)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

一度発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当業界の標準法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる（一般的には、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y. (1982)を参照のこと）。少なくとも約90-95%均質の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98-99%またはそれ以上の均質が望ましい用途に好ましい。部分的または所望の時には均質まで精製

されれば、厳格的に（体外的を含む）またはアッセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実施する際に該ポリペプチドを使用することができる（一般的には、Immunological Methods, 第IおよびII巻、LefkovitsおよびPernis編、Academic Press, New York, N. Y. (1979および1981)を参照のこと）。

本発明において例示されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病状状態を処置することにおいて個々に用いられるだろう。通常、病状に関連する細胞がIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるヒト抗体が適当である（"Treating Human Malignancies and Disorders"と題するU. S. S. N. 085,707を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。例えば、処置に適する典型的な病状状態として、器官移植、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病状としては、自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡および重症筋無力症が挙げられる。

本発明のヒト抗体は、別の抗体、特に病気の一種となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), Leukocyte Typing, Bernardら編、Springer-Verlag, N. Y.

(1984) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) により命名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを挙げることができる。

抗原体は、化学療法剤または免疫抑制剤と共に与えられる別々に投与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスポリンAまたはブリン類薬 (例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン等) が挙げられるだろうが、当業者に周知である多数の他の薬剤 (例えばシクロホスファミド、プレドニソン等) も使用することができる。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫系における当該抗原体の使用を含んで成る。免疫系は2つの成分により特徴づけられ、そして試験管内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー担体」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばがんを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は様々な周知の化学的方法のいずれかによって一断に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫系の製造が当業界で周知であり、例えば "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bul-

let", Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 158-199 (1982) 中にみつけることができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

様々な細胞毒性物質が免疫系における使用に相当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばマウスイソトープ-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212; 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシンおよびシスプラチン; 並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質アメリカキマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シェードモナス菌毒素A、リシン、ジフテリ毒素、リシンA鎖等; または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素 (例えばホスホリパーゼC) を挙げることができる。[1988年12月28日に提出された一般譲渡されたU. S. P. 07/290,562; "Chimeric Toxins", DisnesおよびPhil, Pharmac. Ther., 25: 355-351 (1982); 並びに "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", BaldwinおよびByers 編, 159-173, 224-266 頁, Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。]

免疫系のデリバリー成分は、本発明のヒト免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えば Fabが使用される。典型的には、免疫系中の抗体はヒト IgMまたはIgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物系常領域を用いることもできる。

本発明のヒト抗体およびその医薬組成物は、特に非経口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。非経口投与用組成物は、通常、許容される量、好ましくは水性組成中に溶解された抗体の溶液または混合物を含んで成るだろう。様々な水性担体、例えば水、炭水化された水、0.4% 食塩水、0.3% グリシン等を使用することができる。それらの溶液は無菌であり、通常は殺菌物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件下に必要である時は医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有することができる。それらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に渡り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5% 未満から、通常は少なくとも約1% から、15-20重量%ほどまで及ぶことができ、そして該体の体積、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1 ml の無菌緩衝液と50mgの抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガー液と150mgの抗体を含むように調製することができる。非経口投与可能な組成物の実質的調製方法は当業者に周知であるかまたは明白であり、そして例えば Remington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は貯蔵のために凍結乾燥することができる、そして使用前に適切な担体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で熟知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらす得ること (例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト抗体またはその混合物を含有する組成物は、予防および/または治療処置のために投与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の程度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1〜約200mgの抗体、より好ましくは患者あたり5〜25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状状態、即ち命にかかわるかまたはもしかすると命にかかわる状況において使用されるだろうことを全頭には置かなければならない。そのような場合、本発明のヒト抗体により達成される非毒性物質の最小化および「外来物質」拒絶の低確率の点からみて、実質的過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療に

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本発明の抗体またはその混合物を含有する組成物は、患者の抵抗力を高めるためにまだ病変状態でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の免疫状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1~25mg、特に患者あたり0.5~2.5mgであろう。好ましい予防用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

本発明のヒト抗体は、更に試験管内において広範な用途を見出すことができる。一例として、T細胞の型決定、特異的IL-2レセプターを有する細胞または該レセプターの断片の単離、ワクチンの調製等に抗原的な抗体を利用することができる。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または選択された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、単独

でまたは所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、普通は1つの容器に凍結乾燥状態で提供することができる。抗体は乾燥もしくは粉末と混合されていても未混合であってもよく、緩衝液、例えばTris、リン酸性、炭酸性等の緩衝液、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用説明書のマニキュアと共にキット中に含まれる。一般にこれらの材料は活性抗体の量を基にして約5重量%未満、通常は抗体濃度を基にして少なくとも約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性増量剤または緩衝剤を含めることが望ましく、この場合緩衝剤は全組成の約1~99重量%で存在することができる。キメラ抗体を組合せることができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には乾燥と混合され、上述の抗体製剤と同様に凍結乾燥される。

次の実施例は例示の目的で与えられ、限定のためではない。

## 実 験

### ヒト抗体および重鎖遺伝子の設計

ヒト抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体Euの配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.ら, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Iacの重鎖のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource 中の他のいずれの重鎖配列よりもこの抗体

の重鎖に相同性が高かったためである。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Iac 重鎖配列（一般保護されたU.S.S.N.の186,862と223,037を参照のこと。これらは参考として本明細書中に引用される）をEu重鎖配列と整列した（図1）。各位置において、その位置が次のカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、Euアミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Iac アミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような相補性決定領域(CDR) 中にある（アミノ酸31-35、50-66、99-105）；

(2) その位置ではEuアミノ酸がヒト重鎖配列にまれであり、一方抗-Iac アミノ酸がその位置でヒト重鎖配列に典型的であった（アミノ酸27、93、95、98、107-109、111）；

(3) その位置が抗-Iac 重鎖のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった（アミノ酸30と67）；

(4) 抗-Iac 抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に密接していることを示唆した（アミノ酸43と63）。

残りのアミノ酸はそれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ属してある。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Iac 軽鎖配列をEu軽鎖の配列と整列させた（図2）。その位置が同じカテゴリー（1）~（4）のうちの1つに入らない限り、Euアミノ酸を各位置において選択した（カテゴリー定義中の重

鎖を軽鎖で置き換える）：

(1) CDR（アミノ酸24-34、50-55、89-97）。

(2) Euよりも抗-Iac アミノ酸がより典型的である（アミノ酸48と53）。

(3) CDRに近い（アミノ酸なし；Euと抗-Iac はそれらの位置全てにおいて互に同じであった）。

(4) 結合領域に3次元的に近接している可能性（アミノ酸60）。

重鎖（図3）と軽鎖（図4）の実験のスクレオチド配列は次のようにして選択した。

(1) 該スクレオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。

(2) それらのコード配列の5'側のスクレオチド配列はリーダー（シグナル）配列、即ちMOPC 53抗体の軽鎖のリーダーおよびPCH 108A抗体の重鎖のリーダー（Kabatら、前掲）をコードする。それらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。

(3) コード配列の3'側のスクレオチド配列は、抗-Iac配列の一部であるマウス軽鎖J5セグメントおよびマウス重鎖J5セグメントに従う配列である。それらの配列はスプライス供与配列を含有するために含まれる。

(4) 配列の各末端には、Iba I 3'位での切断およびベクターのIba I 3'位へのクローニングを可能にするためのIba I 3'位が存在する。

ヒト化軽鎖および重鎖遺伝子の発現

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA合成装置を使って4つのオリゴヌクレオチド HES12, HES13, HES14, HES15 (図5A)を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、重鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている(図5B)。各オリゴヌクレオチドは一緒にすると、Iba I 部位での切断を可能にするために各末端に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化重鎖をカバーする。該オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴヌクレオチドを、標準手順 (Maniatis, 前掲を参照のこと) によりATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約3.75Mの濃度において40MのTAA (33mM Tris-HCl, pH 7.9, 66mM酢酸カリウム, 10mM酢酸マグネシウム) 中に一緒に懸濁し、4分間95℃に加熱し、そして4℃にゆっくり冷却した。各オリゴヌクレオチドの反対鎖を合成することにより該オリゴヌクレオチドから完全な遺伝子を合成するために(図5B)、次の成分を100μlの最終容量において添加した:

- 10μl アニーリングしたオリゴヌクレオチド
- 各0.16mM デオキシリボヌクレオチド
- 0.5mM ATP
- 0.5mM DTT

ヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

軽鎖遺伝子はそれらのオリゴヌクレオチドから2部分において合成した。JF01とJF02各々0.5μlを20μlのシークエナーゼ緩衝液(40mM Tris-HCl, pH 7.5, 20mM塩化マグネシウム, 50mM塩化ナトリウム)中に混合し、70℃に3分間加熱し、そして該オリゴヌクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと23℃まで冷却した。JF03とJF04も同様にして処理した。各反応液をDTT 10mMおよび各デオキシヌクレオチド 0.5mMにし、6.5μlのシークエナーゼ(US Biochemicals)を最終容量24μlにおいて添加し、そして37℃で1時間インキュベートして該ヌクレオチドの反応方向鎖を合成した。各反応液にIba IとHind IIIを添加してDNAを消化した(JF02とJF03がオーバーラップする領域の中、従って合成されたDNAの各々の中にHind III部位が存在する: 図6B)。反応液をポリアクリルアミドゲル上で泳動し、Iba I-Hind III断片を精製し、そして標準法によりpUC18中にクローニングした。各断片について数個のプラスミド単離物をジデオキシ法により配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化軽鎖および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製

重鎖 Iba I断片が挿入されているpUC19プラスミドから該断片を精製し、そして標準法により正しい方向においてベクターpVr1(一般に譲渡されたU.S.S.N. 223,037を参照のこと)のIba I部位に挿入し、プラスミドpHuGTAC1(図7)を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの完全重鎖を発現するだろう。

100μl/ml BSA

3.5μl/ml T4 g43タンパク質 (DNAポリメラーゼ)

25μl/ml T4 g44/62タンパク質  
(ポリメラーゼ補助タンパク質)

25μl/ml 45タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を37℃で30分間インキュベートした。次いで10μlのT4 DNAリガーゼを添加し、そして37℃で30分間インキュベートした。70℃で15分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとリガーゼを不活性化した。遺伝子をIba Iで消化するために、反応液に200μl/mlのBSAと1mMのDTTを含む50μlの2×TA、43μlの水、および5μl中の50μlのIba Iを添加した。反応液を37℃で3時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから431bpのIba I断片を精製し、そして標準法によりプラスミドpUC19のIba I部位中にクローニングした。4つのプラスミド単離物を精製し、ジデオキシ法を使って配列決定した。そのうちの1つが正しい配列を有した(図3)。

軽鎖を合成するために、4つのオリゴヌクレオチドJF01, JF02, JF03, JF04 (図6A)を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、軽鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている(図6B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、Iba I部位での切断を可能にするために各末端に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2つの軽鎖 Iba I-Hind III断片が挿入されている各pUC18プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクタープラスミドpVr1(一般に譲渡されたU.S.S.N. 223,037を参照のこと)をIba Iで切断し、標準法により限リン酸しそして2断片を連結せしめた。所望の反応生成物は次のような図状形を有する: ベクター-Iba I断片1-Hind III断片2-Iba I-ベクター。数個のプラスミド単離物を制限マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する1つのプラスミドを選択した。このプラスミドpHuLTAC(図8)は完全なヒト化軽鎖(図4)を含有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの軽鎖を発現するだろう。

ヒト化抗体の合成および検出

プラスミドpHuGTAC1およびpHuLTACをマウス Sp2/O細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上のgptおよびhyc遺伝子(図7, 8)により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロマイシンBに対する耐性に基づいて標準法により選択した。それらの細胞がIL-2レセプターに結合する抗体を分泌したことを確かめるために、細胞からの上清をIL-2レセプターを発現することが知られているHUT-102細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセイン接合ヤギ抗ヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そしてFACSscanサイトフルオロメーター上で蛍光について分析した。結果(図9A)は、ヒト化抗体がそれらの細胞には結合するが、IL-2レセプターを発現しないJerkal T細胞には結合しない。

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac 抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B・C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生産する細胞をマウスに注入し、そして生じた腹水を回収した。標識法に従って Affigel-10 支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) 上に調製されたナグ抗ヒト免疫グロブリン抗体のアフィニティークラムに通過させることにより、腹水からヒト化抗体を實質上均質まで精製した。もとの抗-Tac 抗体と比較してヒト化抗体の親和力を測定するために、競合的結合実験を行った。約  $5 \times 10^5$  個の HUT-102 細胞を懸濁液(10-40ng)の抗-Tac 抗体とヒト化抗-Tac 抗体と共に4℃で30分間インキュベートした。次いで細胞に 100ng のビオチン化抗-Tac を添加し、そして4℃で30分間インキュベートした。この量の抗-Tac は細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1%アジ化ナトリウムを含む2Mのリン酸緩衝化塩液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで 250ng のフィコニトリン結合アビジンと共に細胞を4℃で30分間インキュベートし、この結合アビジンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tac に結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で固定し、そして FACSCAN ナイトフルオロメーター上で蛍光分析した。

第一段階における結合体としての抗-Tac 抗体の使用量を増加していくと(10-40ng)、第二段階において細胞に結合

することができたビオチン化抗-Tac の量を減少させ、従って最終段階において結合したフィコニトリン結合アビジンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(図10A)。当量(20ng)の抗-Tac および結合体として使ったヒト化抗-Tac は、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ親和力(3-4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一方がずっと大きな親和力を有するなら、より有効にビオチン化抗-Tac と競争し、従って蛍光をもっと減少させたであろうからである。

#### ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における最適な使用のため、ヒト化抗体はIL-2レセプターを発現している体内のT細胞を破壊することができるべきである。抗体が壊滅的細胞を破壊する1つの機構は、ADCCと略される抗体依存性細胞障害作用(Fundamental Immunology, Paul H. 編, Raven Press, New York (1934), 681頁)であり、この場合抗体は、標的細胞と標的を溶解することができるマクロファージのようなエフェクター細胞との間に架橋を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac 抗体がADCCを媒介することができるかどうかを決定するために、標識法によりクロム放出アッセイを行った。詳しくは、IL-2レセプターを発現するヒト白血病 HUT-102 細胞を $^{51}\text{Cr}$ と共にインキュベートし、それらにこの放射性標識を吸収させた。次いで HUT-102 細胞を過剰量の抗-Tac またはヒト化抗-Tac 抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト細胞とIL-2との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血単核細胞である30:1または100:1の比のエフェクター細胞と共に4時間インキュベートした。標的 HUT-102 細胞の溶解を示す $^{51}\text{Cr}$ の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクター細胞においても、抗-Tac は有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一方ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T細胞白血病または他のT細胞介在性の病気を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1

ADCC後の $^{51}\text{Cr}$  放出率(%)

抗 体	エフェクター:標的比	
	30:1	100:1
抗-Tac	4%	<1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト免疫グロブリンが他の抗体の多数の利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tac マウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒトIL-2レセプター免疫グロブリンは、より経済的に生産することができ、そして実質的に少ない外発アミノ酸配列を含むことができる。ヒト患者への注入時に抗原性となる可能性の減少は、上記の基礎に従って設計された免疫グロブリンによって有意な質的改善を意味する。

本発明を明確化および理解のために説明および実施例によ

り説明詳細に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。

[illegible]

FIG. 1

[illegible]

FIG\_2

16	25	33	40	56	57
TCTAGATGGCGATAGCTGGACCTCTTCTCTCTTCTGGCTGACGTCACGGCGGCTGCTG					
H C V S W I F L L S C G T A C G V H					
70	80	93	100	110	120
CTCAGCTGGACCTCTTCTGCAATCTGCGGCTGAAGTCAAGAAACCTGCTGCTGACGGTGAAGG					
S Q V J L Y C S C A E Y C A L P G S S Y L					
139	140	150	163	170	180
TCTGCTGCGAAGGCTTCTGCGGTACACCTTTACTAGCTACGATGCTCACTGGTACGGCAGG					
Y S C K A S G G T T F T S T R M H W V R Q					
190	200	213	220	230	240
CGCTGCGACAGGCTTCTGCAATGCTATTGATATTAATCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG					
A P C G G L E W I G Y T I M P S T G T T E					
250	260	270	280	290	300
ACAATGCAAGATTCGAAGCAAGCAAGCAAAATTACTGCGACGCAATCGACCAATACAGCGT					
T N Q L F E D L A T I T A D E S T Y T A					
310	320	330	340	350	360
ACATCGAAGCTGACGACCTGACATCTGACGACACCGGCTGCTATTAAGCTCTCAAGACGGG					
T M E L S S C L R S E D T A Y T Y T C A R G					
370	380	390	400	410	420
CGCGGCTCTTCTGACTACTTGGCGGCGGCAAGCGCTGCTGACAGTCTGCTGCTGCTGCTG					
G C V F J T W C G C G T G Y T Y S S					
430					
TAAAGAGCTGTAGA					

FIG. 3.

10	20	30	40	50	60
TCTAGATGCAAC	AGCCATAGCCCT	TCTGCTATGCG	TCTGCTGCTATGCT	CTCCGACATGAA	
M E T	D T L L L	W Y L W Y L	W Y P G S		
70	80	90	100	110	120
CGCCAGATATTC	AGCATAGCCATCT	GTGATCTAGCCCT	CTGCTGACGCTGCGG	ATATGCG	
T G C	D I Q M T Q S	P S T L S	A S Y G D R		
130	140	150	160	170	180
TCACCATAAAGCT	CTCTGCGACGCTCAAGT	ATAAGTTACATG	CTGCTGACGACAGAGA		
Y T I T T C S	A S S S I S Y	H H W T Q Q X			
190	200	210	220	230	240
CAGCGAAAGCT	CTGCAAGCTCTAATTTAT	TACCATGCAAGCTCTGCTGCG	ATGCGTCTCT		
P G K A P A L L I T T I S	S L A S G Y P				
250	260	270	280	290	300
CTGCTTCTAGCG	CGAGTCTATCTGCGACGCA	TTCACCTTCAGCAAT	CTGCTCTGCG		
A R F S G S G S G T E F T L T I S S L O					
310	320	330	340	350	360
CAGATGATTCTGCG	CTATTACTGCTATCAAGG	CACTACTTACCG	CTGCTCTGCG		
P O D F A T Y T I C H O R S T Y T P L T F S					
370	380	390	400		
AGCGCGACCAAGCT	CTGAGCTTAAGCTAC	CTTTCTAGA			
Q G T X V E V I					

FIG. 4.

MSIS	MSIN	MSIS	MSIN
MSIS12	MSIN12	MSIS13	MSIN13
MSIS14	MSIN14	MSIS15	MSIN15
MSIS16	MSIN16	MSIS17	MSIN17
MSIS18	MSIN18	MSIS19	MSIN19
MSIS20	MSIN20	MSIS21	MSIN21
MSIS22	MSIN22	MSIS23	MSIN23
MSIS24	MSIN24	MSIS25	MSIN25
MSIS26	MSIN26	MSIS27	MSIN27
MSIS28	MSIN28	MSIS29	MSIN29
MSIS30	MSIN30	MSIS31	MSIN31
MSIS32	MSIN32	MSIS33	MSIN33
MSIS34	MSIN34	MSIS35	MSIN35
MSIS36	MSIN36	MSIS37	MSIN37
MSIS38	MSIN38	MSIS39	MSIN39
MSIS40	MSIN40	MSIS41	MSIN41
MSIS42	MSIN42	MSIS43	MSIN43
MSIS44	MSIN44	MSIS45	MSIN45
MSIS46	MSIN46	MSIS47	MSIN47
MSIS48	MSIN48	MSIS49	MSIN49
MSIS50	MSIN50	MSIS51	MSIN51
MSIS52	MSIN52	MSIS53	MSIN53
MSIS54	MSIN54	MSIS55	MSIN55
MSIS56	MSIN56	MSIS57	MSIN57
MSIS58	MSIN58	MSIS59	MSIN59
MSIS60	MSIN60	MSIS61	MSIN61
MSIS62	MSIN62	MSIS63	MSIN63
MSIS64	MSIN64	MSIS65	MSIN65
MSIS66	MSIN66	MSIS67	MSIN67
MSIS68	MSIN68	MSIS69	MSIN69
MSIS70	MSIN70	MSIS71	MSIN71
MSIS72	MSIN72	MSIS73	MSIN73
MSIS74	MSIN74	MSIS75	MSIN75
MSIS76	MSIN76	MSIS77	MSIN77
MSIS78	MSIN78	MSIS79	MSIN79
MSIS80	MSIN80	MSIS81	MSIN81
MSIS82	MSIN82	MSIS83	MSIN83
MSIS84	MSIN84	MSIS85	MSIN85
MSIS86	MSIN86	MSIS87	MSIN87
MSIS88	MSIN88	MSIS89	MSIN89
MSIS90	MSIN90	MSIS91	MSIN91
MSIS92	MSIN92	MSIS93	MSIN93
MSIS94	MSIN94	MSIS95	MSIN95
MSIS96	MSIN96	MSIS97	MSIN97
MSIS98	MSIN98	MSIS99	MSIN99
MSIS100	MSIN100	MSIS101	MSIN101
MSIS102	MSIN102	MSIS103	MSIN103
MSIS104	MSIN104	MSIS105	MSIN105
MSIS106	MSIN106	MSIS107	MSIN107
MSIS108	MSIN108	MSIS109	MSIN109
MSIS110	MSIN110	MSIS111	MSIN111
MSIS112	MSIN112	MSIS113	MSIN113
MSIS114	MSIN114	MSIS115	MSIN115
MSIS116	MSIN116	MSIS117	MSIN117
MSIS118	MSIN118	MSIS119	MSIN119
MSIS120	MSIN120	MSIS121	MSIN121
MSIS122	MSIN122	MSIS123	MSIN123
MSIS124	MSIN124	MSIS125	MSIN125
MSIS126	MSIN126	MSIS127	MSIN127
MSIS128	MSIN128	MSIS129	MSIN129
MSIS130	MSIN130	MSIS131	MSIN131
MSIS132	MSIN132	MSIS133	MSIN133
MSIS134	MSIN134	MSIS135	MSIN135
MSIS136	MSIN136	MSIS137	MSIN137
MSIS138	MSIN138	MSIS139	MSIN139
MSIS140	MSIN140	MSIS141	MSIN141
MSIS142	MSIN142	MSIS143	MSIN143
MSIS144	MSIN144	MSIS145	MSIN145
MSIS146	MSIN146	MSIS147	MSIN147
MSIS148	MSIN148	MSIS149	MSIN149
MSIS150	MSIN150	MSIS151	MSIN151
MSIS152	MSIN152	MSIS153	MSIN153
MSIS154	MSIN154	MSIS155	MSIN155
MSIS156	MSIN156	MSIS157	MSIN157
MSIS158	MSIN158	MSIS159	MSIN159
MSIS160	MSIN160	MSIS161	MSIN161
MSIS162	MSIN162	MSIS163	MSIN163
MSIS164	MSIN164	MSIS165	MSIN165
MSIS166	MSIN166	MSIS167	MSIN167
MSIS168	MSIN168	MSIS169	MSIN169
MSIS170	MSIN170	MSIS171	MSIN171
MSIS172	MSIN172	MSIS173	MSIN173
MSIS174	MSIN174	MSIS175	MSIN175
MSIS176	MSIN176	MSIS177	

**FIG. 5.**





[illegible][illegible]

95/67-9/2241

11. MANAGEMENT AND TRAINING OF PERSONNEL IS LACKING

1. Lines 10, 11 and 13, Group 1 is a combination of  
unconjugated, non-antigenic immunoglobulin specific  
for IgG and a number of reacting cell receptors  
which are immunoglobulin, situated in Class 3B,  
subclass d) and also the subclass e).

11. Serial 3-13 and 22. cover to a confidential source  
during investigation, classified to Group 433, subgroups  
05.1, 17.2 and 4400 and subgroups 147.

111. Lines 16 and 17, above to 111 containing a three  
sided Vagien and setting C11 of an immunologic  
test, classified as Class 31, subclass 17.

The divisions are groups according to the unit or common concept collected in this I.D. The divisions are abstract, and from the direct business of the following persons:

The following features:

Intervenor Group III and Group II are related to the early constructive phase in inter-individual process facilitation.

Intervenor Group I and Group II are related to activities and communication. Also, the product of Group III can be seen as a communication system, which differs from the system of Group II.

U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1965		REF ID: A66666	
Y	<p><u>Science</u>, Volume 129 Issued 20 September 1965  <u>TRANSFORMATIONS</u> provide novel chromatin antibodies," pp. 1202-1207. See entire document.</p>	10-27	
Y	<p><u>Science</u>, Volume 132 Issued 09 May 1966 <u>MALMQUIST</u>  <u>ON</u> the structure, function and expression of <u>lactose</u>  <u>inducible</u> receptors on normal and malignant lymphocytes," pp. 717-722. See entire document.</p>	1-17	
Y	<p><u>Journal of Immunology</u>, Volume 126(4) Issued  <u>IN</u> April 1961 <u>DEAN</u> <u>1964</u>, "A monoclonal antibody  <u>(Anti-Tac)</u> reacting with activated and partially  <u>activated</u> human T cells". See entire document.</p>	1-6, 10-15 10-13 & 15-17	
Y	<p><u>Science</u>, Volume 129 Issued 25 March 1966  <u>VIRGILIEN ET AL</u>, "Antibodying human antibodies:  <u>grafting</u> an antilysozyme activity," pp. 1134-  1136. See entire document.</p>	10-27 1-17	
Y	<p><u>Nature</u>, Volume 121 Issued 29 May 1966 <u>JONES ET AL</u>  <u>ON</u> the complementarity-determining regions  <u>in</u> a human antibody with those from a mouse,"  pp. 121-123. See entire document.</p>	10-27 1-17	
Y	<p><u>Nature</u>, Volume 132 Issued 24 March 1966 <u>REICHMANN</u>  <u>ET AL</u>, "Antibodying human antibodies for therapy"  pp. 113-116. See entire document.</p>	10-27 1-13 & 15-17	

第1頁の続き

④int. Cl. 1	発明記号	片内整理番号
A 61 K 39/395	U	8829-4C
C 07 K 15/06		7731-4H
C 12 N 5/10		
		15/13
/(C 12 P 21/09		
C 12 R 1:91)		

優先権主張 ④1989年2月13日④米国(U S)④310,252

④発 明 者 セリク, ハロルド エドウィン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニー  
スロープ アベニュー 1673